

Pakan buatan untuk udang windu (*penaeus monodon*)



Daftar isi

Daftar isi..... i

Prakata ii

1 Ruang lingkup..... 1

2 Acuan normatif..... 1

3 Istilah dan definisi 1

4 Deskripsi 1

5 Klasifikasi..... 2

6 Persyaratan 2

7 Cara pengukuran dan pemeriksaan 3



Prakata

Berdasarkan perkembangan ilmu dan teknologi, standar ini merupakan revisi dari SNI 02-2724-1992, *Pakan buatan bagi udang* yang dipersiapkan oleh Panitia Teknis Pembudidayaan Perikanan yang terdiri dari unsur-unsur pemerintah, perguruan tinggi dan peneliti, produsen/pengusaha pakan udang dan konsumen.

Standar disusun untuk menunjang ekspor non migas, melindungi konsumen serta sebagai penjamin mutu produk, dan digunakan oleh pengusaha pakan udang windu dan petambak.

Adapun penyusunannya menggunakan acuan selain standar yaitu:

- a) Metode Analisis PPOMN, 2001 (belum dipublikasikan)
- b) National Research Council
- c) Data dan informasi teknis dari pihak dan instansi terkait
- d) Hasil-hasil penelitian dari Lembaga-lembaga Penelitian yang terkait.

Standar ini merupakan hasil pembahasan rapat-rapat teknis, prakonsensus dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 20 - 21 Pebruari 2002 di Bogor.



Pakan buatan untuk udang windu (*Penaeus monodon*)

1 Ruang lingkup

SNI *Pakan buatan untuk udang windu (penaeus monodon)* meliputi deskripsi, istilah dan definisi, klasifikasi, persyaratan (mutu, pengemasan dan penandaan), cara pengukuran dan pemeriksaan untuk semua pakan udang windu yang diperjualbelikan.

2 Acuan normatif

SNI 01-0428-1989, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI 01-2891-1992, *Cara uji makanan dan minuman*.

SNI 01-4266-1996, *Pakan ikan mas*.

SNI 01-4087-1996, *Pakan buatan bagi ikan lele*.

SNI 01-4413-1997, *Pakan buatan bagi ikan sidat*.

AOAC-1995, *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*.

3 Istilah dan definisi

3.1

pakan *starter*

pakan untuk udang windu ukuran tebar sampai dengan ukuran 3 gram

3.2

pakan *grower*

pakan untuk udang windu ukuran madya (3 - 20 gram)

3.3

pakan *finisher*

pakan untuk udang windu ukuran besar (> 20 gram)

3.4

nutrisi

zat yang dibutuhkan untuk pertumbuhan udang

3.5

udang windu

jenis udang yang secara taksonomi termasuk spesies *penaeus monodon*, *fabricus*

4 Deskripsi

Pakan buatan untuk udang windu (*penaeus monodon*) merupakan campuran dari berbagai bahan baku pakan yang diformulasikan dengan kandungan nutrisi tertentu dalam bentuk

remah dan pellet untuk meningkatkan pertumbuhan udang windu yang dibudidayakan, dan tidak mengandung cemaran yang dapat menimbulkan gangguan kesehatan, serta aman terhadap lingkungan.

5 Klasifikasi

Pakan buatan untuk udang windu (*penaeus monodon*) diklasifikasikan menjadi 5, yaitu: *Starter 1*, *Starter 2*, *Grower 1*, *Grower 2*, dan *Finisher*.

Tabel 1 Klasifikasi pakan dan berat udang windu

	<i>Starter 1</i>	<i>Starter 2</i>	<i>Grower 1</i>	<i>Grower 2</i>	<i>Finisher</i>
Berat udang windu (gram)	< 1	>1 - 3	3-10	10-20	> 20

6 Persyaratan

6.1 Persyaratan mutu

Tabel 2 Persyaratan mutu pakan buatan untuk udang windu (*penaeus monodon*)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan mutu				
			<i>Starter 1</i>	<i>Starter 2</i>	<i>Grower 1</i>	<i>Grower 2</i>	<i>Finisher</i>
1	Air	% b/b	maks 10	maks 10	maks 10	maks 10	maks 10
2	Protein (N x 6,25)	% b/b	min 40	min 38	min 37	min 36	min 35
3	Lemak	% b/b	min 6	min 4	min 4	min 4	min 4
4	Serat kasar	% b/b	maks 3	maks 3	maks 3	maks 3	maks 4
5	Abu	% b/b	maks 15	maks 15	maks 15	maks 15	maks 15
6	Kestabilan dalam air (setelah 2 jam)	% b/b	min 90	min 90	min 90	min 90	min 90
7	Nitrogen bebas	% b/b	maks 0,15	maks 0,15	maks 0,15	maks 0,15	maks 0,15
8	Cemaran mikroba -ALT	kol/g	maks 5×10^3	maks $7,5 \times 10^3$	maks $7,5 \times 10^3$	maks $7,5 \times 10^3$	maks $7,5 \times 10^3$
	- Kapang	kol/g	maks 50	maks 50	maks 50	maks 50	maks 50
	- Salmonella	neg/25g	neg	neg	neg	neg	neg
9	Antibiotika	ppb	0	0	0	0	0
Keterangan : neg = negatif b/b = berat per berat ALT = angka lempeng total kol/g = koloni/gram ppb = part per billion							

6.2 Pengemasan

Pakan buatan untuk udang windu (*penaeus monodon*) harus dikemas dalam wadah tertutup rapat tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

6.3 Penandaan

Pada kemasan harus dicantumkan ketentuan-ketentuan sesuai dengan Undang-undang No. 8 Tahun 1999 tentang *Perlindungan Konsumen* seperti di bawah ini:

- a) merk dagang,
- b) nama produsen,
- c) klasifikasi pakan (*starter, grower, finisher*),
- d) bobot netto,
- e) jenis bahan yang digunakan,
- f) jenis bahan yang ditambahkan,
- g) kandungan nutrisi yang terdiri dari:
 - 1) air, maks,
 - 2) protein, min,
 - 3) lemak, min,
 - 4) serat kasar, maks,
 - 5) abu, maks.
- h) cara penyimpanan,
- i) cara penggunaan,
- j) bentuk (*crumble/remah, pellet*) dan sifat fisik (*tenggelim*),
- k) kestabilan dalam air,
- l) tanggal kadaluarsa,
- m) kode produksi,

Penandaan dalam kemasan harus menggunakan Bahasa Indonesia.

7 Cara pengukuran dan pemeriksaan

7.1 Cara pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 01-0428-1989, *Pentunjuk pengambilan contoh padatan*.

Cara persiapan contoh sesuai SNI 01-2891-1997, *Cara uji makanan dan minuman* butir 4.

7.2 Cara uji

7.2.1 Air

Cara uji air sesuai SNI 01-2891-1992, *Cara uji makanan dan minuman* butir, 5. 1.

7.2.2 Protein

Cara uji protein sesuai SNI 01-2891-1992 , *Cara uji makanan dan minuman* butir, 7. 1.

7.2.3 Lemak

Cara uji lemak sesuai SNI 01-2891-1992, *Cara uji makanan dan minuman* butir, 8.1

7.2.4 Serat kasar

Cara uji serat kasar sesuai SNI 01-2891-1992, *Cara uji makanan dan minuman*, butir 11.

7.2.5 A b u

Cara uji abu sesuai SNI 01 -2891-1992, *Cara uji makanan dan minuman*, butir 6. 1.

7.3 Kestabilan dalam air

7.3.1 Prinsip

Kehilangan bobot pada perendaman dalam air dengan kondisi tertentu dianggap sebagai kadar kestabilan dalam air.

7.3.2 Peralatan

- a) keranjang kawat (*wire basket*), mesh size 1 mm, ukuran 6 cm x 6 cm x 6 cm.
- b) aerator kecepatan 2,5 - 3 liter/menit.
- c) neraca.
- d) akuarium.
- e) oven.

7.3.3 Cara kerja

- a) Keringkan keranjang kawat dalam oven pada suhu 60⁰C hingga berat konstan.
- b) Timbang 10 g bahan contoh yang telah diketahui kadar air dan masukkan ke dalam keranjang kawat.
- c) Rendam keranjang kawat kedalam akuarium yang berisi air laut bersalinitas sesuai dengan media budidaya udang windu. Ketinggian air dalam akuarium 30 cm, ketinggian keranjang 5 cm dari dasar akuarium, berikan aerasi, dengan batu aerator diletakan pada dasar akuarium persis di bawah keranjang kawat.
- d) Lakukan perendaman selama 2 jam.
- e) Angkat keranjang kawat tersebut lalu keringkan pada suhu 60⁰C, kemudian timbang hingga berat konstan.

Perhitungan:

$$\text{Kadar kestabilan dalam air} = \frac{b}{a} \times 100\%$$

dengan pengertian:

- a adalah berat contoh kering sebelum perendaman (g);
- b adalah berat contoh kering setelah perendaman (g).

7.4 Nitrogen bebas

7.4.1 Prinsip

Senyawa nitrogen yang terdapat dalam contoh diuraikan oleh NaOH, kemudian amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borat dan dititar dengan larutan asam standar.

7.4.2 Peralatan

- a) alat penyulingan dan kelengkapannya;
- b) pemanas;
- c) neraca analitik.

7.4.3 Perekasi

- a) Larutan indikator
10 ml hijau bromkresol 0,1% dicampur dengan 2 ml merah metil 0,1% dalam alkohol 95%.
- b) Larutan asam borat indikator 500 ml asam borat 2% dicampur dengan 5 ml larutan indikator.
- c) Larutan asam klorida, HCl 0,1 N.
- d) Larutan natrium hidroksida, NaOH 30%.

Larutkan natrium hidroksida ke dalam 350 ml air, simpan dalam botol bertutup karet.

7.4.4 Cara kerja

- a) Timbang seksama 5 gram cuplikan, masukkan ke dalam labu didih 250 ml, tambahkan 100 ml air suling dan 10 ml NaOH 30%, hubungkan dengan alat penyuling.
- b) Sulingkan selama lebih kurang 20 menit, sebagai penampung gunakan 10 ml larutan asam borat 2% yang telah dicampur indikator.
- c) Bilasi ujung pendingin dengan air suling.
- d) Titar dengan larutan HCl 0,1 N.
- e) Kerjakan penetapan blangko.

Perhitungan:

$$\text{Nitrogen bebas} = \frac{(b - c) \times d \times 0,014}{a} \times 100\%$$

dengan pengertian :

- a adalah bobot cuplikan, dalam gram;
- b adalah volume HCl 0,1 N yang dipergunakan peniteran contoh, dalam ml,
- c adalah volume HCl 0,1 N yang dipergunakan peniteran blangko, dalam ml,
- d adalah Normalisasi HCl

7.5 Cemarkan mikroba

Cara uji cemarkan mikroba (*Salmonella*, Penentuan Angka Lempeng Total (ALT), uji Kapang). sesuai SNI 19-2897-1992, *Cara uji cemarkan mikroba*.

7.6 Antibiotik

Penetapan residu tetrasilin dan senyawa sejenis (tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, doksisiklin).

Metode : Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Prinsip : Tetrasilin dan senyawa sejenis diekstraksi dari contoh, kemudian dimurnikan dan analisis secara kromatografi cair kinerja tinggi.

7.6.1 Peralatan

- a) Seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang dilengkapi dengan detektor spektrometer UV-VIS atau yang setara memiliki panjang gelombang 200 nm - 450 nm.
- b) Cartridge atau mini kolom Baker 10 C₁₈ (terbaik) atau yang setara Bond Elut C₁₈.
- c) Blender atau *Ultra Turrax*.
- d) Sentrifus, dilengkapi dengan tabung sentrifuga alas bulat 50 ml.

7.6.2 Pereaksi

- a) Larutan natrium edetat 0,1 M.
- b) Buffer McIlvaine.
- c) Metanol murni pereaksi.
- d) Asam oksalat, murni pereaksi.
- e) Air suling, kemurnian tinggi.

7.6.3 Baku pembanding

Tetrasiklin Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI) atau yang setara.

- a) Oksinetrasiklin, Baku Pernbanding Farmakope Indonesia (BPFI) atau yang setara.
- b) Klortetrasiklin, Baku Pernbanding Farmakope Indonesia (BPFI) atau yang setara.
- c) Doksisiklin, Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI) atau yang setara.

Masing-masing dibuat larutan baku tunggal dalam metanol dengan kadar 0,01 ppm - 10,0 ppm (tergantung kepekaan dan optimalisasi yang tersedia) serta baku campuran dalam metanol.

7.6.4 Cara Kerja

- a) Timbang seksama 5,0 g contoh yang sebelumnya telah dihomogenkan ke dalam tabung dan diblender atau gunakan *ultra Turrax* 3 kali. tiap kali menggunakan 20 ml. 20 ml dan 10 ml larutan campuran Na₂EDTA 0,1 M - McIlvaine (pH 4,0). Sebaiknya di luar tabung diletakkan atau direndam dalam air dan batu es (dingin).
- b) Kumpulkan masing-masing beningan (bagian yang jernih, alikuot) dalam tabung sentrifuga 50 ml, kemudian sentrifus 4.000 rpm selama 10 menit.
- c) Beningan yang diperoleh disaring menggunakan penyaring membran 0,45 µm, kumpulkan filtrate.
- d) Siapkan *Cartridge* atau mini kolom Baker 10 C₁₈ kemudian dicuci dengan 20 ml air suling, buang eluat
- e) Pindahkan secara kuantitatif filtrate 6.c kedalam *Cartridge* atau mini kolom, kemudian dilusi dengan 10 ml larutan asam oksalat 0,01 M dalam methanol, kumpulkan eluat.
- f) Kondisikan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan suntikan eluat dan larutan baku pembanding tunggal dan campuran antibiotika.

7.6.5 Kondisi dan pengaturan alat

- a) Fase gerak dan kolom yang digunakan harus sesuai, seluruh fase gerak yang digunakan terlebih dahulu harus diawaudarakan (dihilangkan gas yang larut) menggunakan sarana yang ada (ultrasonik, penyaring membran 0,45 µm, atau aliran gas helium).
- b) Atur kondisi alat hingga diperoleh resolusi (pemisahan) yang baik dan respon yang optimal. Penggunaan kolom yang dan fase gerak disesuaikan dengan sarana yang ada dan dapat dipilih dengan kondisi berikut :

- Jika digunakan kolom LiChrosorb RP-8, panjang kolom 250 mm, diameter dalam 4,0 mm, ukuran partikel 10 μm . Digunakan campuran fase gerak methanol asetonitril asam oksalat dalam air 0,01M dengan perbandingan (pH 2,0) dengan perbandingan (1 : 1,5 : 2) dan panjang gelombang detektor 350 nm.
- Jika digunakan kolom Intersil TSK C-8-80TS, panjang kolom 150 mm, diameter dalam 4,6 mm. Digunakan campuran fase gerak methanol asetonitril TFA (asam Trifluoroasetat dalam air) 0,01M dengan perbandingan (3 : 3 : 14). Laju aliran 1 ml/menit dan panjang gelombang detektor 350 nm.
- Jika digunakan kolom Intersil C8, panjang kolom 150 mm, diameter dalam 4,6 mm. Digunakan campuran fase gerak : methanol-asetonitril - TFA (asam trifluoroasetat dalam air) 0,01 M dengan perbandingan (2 : 3 : 15). Laju aliran 1ml/menit dan panjang gelombang detektor 350 nm.
- Jika digunakan kolom Intersil Ph, panjang kolom 150 mm, diameter dalam 4,6 mm. Digunakan campuran fase gerak: metanol - asetonitril - TFA (asam trifluoroasetat dalam air) 0,01 M dengan perbandingan (6 : 19 : 75). Laju aliran 1 ml/menit dan panjang gelombang detektor 350 nm.
- Jika digunakan kolom Chemosorb 3C8. panjang kolom 75 mm, diameter dalam 4,6 mm, ukuran partikel 3 μm . Digunakan campuran fase gerak : metanol-asetonitril-asam oksalat dalam air 0,01 M (pH 3,0) dengan perbandingan (1: 1,5:7). Laju aliran 1 ml/menit dan panjang gelombang detektor 350 nm.
- Jika digunakan kolom Nucleosil 5C8, panjang kolom 150 mm, diameter dalam 4,6 mm ukuran partikel 5 μm . Digunakan campuran fase gerak : metanol-asetonitril -asam oksalat dalam air 0,01 M (pH 2,0) dengan perbandingan (1 : 1,5 : 7,5) dan panjang gelombang detektor 400 nm.
- Jika digunakan kolom Nucleosil 5C18, panjang kolom 250 mm, diameter dalam 4,0 mm, ukuran partikel 10 μm . Digunakan campuran fase gerak : metanol-asetonitril asam oksalat dalam air 0,02 M (pH 2,0) dengan perbandingan (1: 11,5 : 2) dan panjang gelombang detektor 400 nm.
- Jika digunakan kolom μ Bondapak, panjang kolom 300 mm, diameter dalam 3,9 mm, ukuran partikel 10 μm . Digunakan campuran fase gerak: metanol-asetonitril-asam oksalat dalam air 0,2M (pH 2,0) dengan perbandingan (1 : 1 : 4) dan panjang gelombang detektor 400 nm.

7.6.6 Perhitungan

Menggunakan kurva baku (perlu dibuat blanko contoh yang diperkaya atau di "spike" dengan baku perbandingan dengan kadar bervariasi) atau perbandingan tinggi atau luas area puncak contoh dengan baku perbandingan yang sesuai.

7.7 Penetapan kadar residu kloramfenikol

7.7.1 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Prinsip : kloramfenikol ditetapkan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi setelah diekstraksi dari cuplikan.

7.7.1.1 Peralatan

- a) Erlenmeyer bertutup asah 225 ml;
- b) corong pisah 125 ml;

- c) labu alas bulat 100 ml;
- d) *rotary evaporator*;
- e) labu tentukur 50 ml, 100 ml.

7.7.1.2 Pereaksi

- a) etil asetat.
- b) petroleum eter.
- c) asetonitril.
- d) natrium asetat.
- e) asam asetat.

7.7.1.3 Cara kerja

7.7.1.3 Larutan uji

- a) Timbang sejumlah lebih kurang 25 g contoh yang telah dihaluskan dan homogen, masukkan kedalam erlenmeyer, tambahkan 50 ml etil asetat, tutup erlenmeyer dan kocok kuat selama 1 menit – 2 menit.
- b) Saring ekstrak Etil asetat menggunakan kertas saring. Pipet 25 ml filtrat, masukkan kedalam labu alas bulat, dan pekatkan dengan rotary evaporator sampai lebih kurang 3 ml.
- c) Tuang ekstrak pekat secara kuantitatif ke dalam corong pisah dengan bantuan 5 ml etil asetat, tambahkan 35 ml Petroleum eter dan 3,0 ml air asetonitril (4 :1) kocok.
- d) Biarkan lapisan air terpisah (sentrifus jika terbentuk emulsi). Lewatkan lapisan air ke dalam kolom papat kecil yang telah diisi celite 545 setinggi 1,5 cm.
- e) Tampung ekstrak air, saring dengan milipore 0,45 μ m dan suntikkan ke Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

7.7.1.3.2 Larutan baku

- a) Timbang sejumlah lebih kurang 25 mg baku kloramfenikol, masukkan kedalam labu 50 ml dan larutkan dalam pelarutan air setonitril (4.1) sampai tanda (larutan stok).
- b) Pipet 1,0 ml larutan stok baku dan masukkan kedalam labu tentukur 100 ml encerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan Intermediet).
- c) Buat larutan baku seri dengan cara memipet larutan intermediet berturut-turut 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml dan 4,0 ml kemudian masukkan masing-masingnya ke dalam labu tentukur 50 ml dan encerkan dengan pelarut sampai tanda.

7.7.1.3.3 Cara penetapan

Suntikkan larutan uji dan larutan baku secara terpisah kedalam Kromatografi cair kinerja tinggi dengan kondisi sebagai berikut :

- Kolom : RP 18,5 ptm (diameter dalam 0,46 cm dan panjang 15 cm).
- Fase Gerak : Air -Asetonitril - Dapar Asetat (75 : 25 : 1).
Dapar Asetat = Natrium asetat 1 M - asam asetat 1 M (1 : 1).
- Kecepatan Air : 07 ml/min.
- Detector UV dengan panjang gelombang 276 nm.
- Volume penyuntikan : 20 μ l.

7.7.1.3.4 Perhitungan

Kadar residu Kloramfenikol dalam contoh dihitung menggunakan persamaan garis:

$$y = bx + a$$

7.7.2 Metode Kromatografi Gas.

Prinsip : Sampel diinkubasi dengan β -glukuronidase menjadi kloramfenikol bebas. Kloramfenikol diekstraksi dan dimurnikan, kemudian ditetapkan secara Kromatografi Gas.

7.7.2.1 Peralatan

- Seperangkat alat Kromatografi Gas yang dilengkapi dengan detektor penangkap elektron (ECD Ni-⁶³), kolom kapiler DB-1, panjang 30 meter, diameter dalam 0,254 mm dengan ketebalan lapis tipis 0,25 μ m atau yang setara.
- Kalorn mini Baker 10 SPE C₁₈ (Oktadesil) atau Cartridge C₁₈ atau yang setara.
- Inkubator.
- Alat vakum Manifold untuk membantu pencucian alat Cartridge C₁₈
- Homogenizer atau Ultra Turrax.
- Sentrifus beserta tabung sentrifuga alas bulat 50 ml.

7.7.2.2 Pereaksi

- Metanol, murni pereaksi.
- Etil asetat, murni pereaksi.
- Heksan, murni pereaksi.
- Kloroform, murni pereaksi.
- Air suling kemurnian tinggi, resistan spesifik 18 mega ohm/cm.
- Larutan dapat mengandung masing-masing 0,11 M KH₂PO₄ dan Na₂HPO₄, pH 6,8 \pm 0,1; pH diatur hingga 6,8 dengan penambahan pereaksi kering secukupnya.
- Tipe LX β -glukuronidase. Encerkan dengan larutan dapar (F) hingga 4.000 unit/ml. Siapkan segera sebelum digunakan.
- Asetonitril, murni pereaksi.
- Sikloheksan, murni pereaksi.
- Natrium klorida, murni pereaksi. Siapkan larutan 4 % dalam air suling dan simpan pada suhu ruang.
- Sylon HTP atau :

- heksametildisilazan (HMDS)	3 bagian
- Klorotrimetilsilan	1 bagian
- Piridin	9 bagian

7.7.2.3 Baku pembanding

Kloramfenikol BPF (Baku Pembanding Farmakope Indonesia) atau yang setara, Baku Internal metakloramfenikol (USDA, FSIS. Mid Western Lab. Standards Repository).

7.7.2.4 Penyiapan larutan baku

- Siapkan masing-masing Larutan Baku Persediaan Kloramfenikol dan Metakloramfenikol 500 μ g/ml, dengan menimbang seksama 50,0 mg baku dan dilarutkan serta diencerkan dengan metanol hingga 100,0 ml.

- b) Siapkan masing-masing Larutan Baku Intermediet 50 µg/ml, dengan memipet 10,0 ml masing-masing Larutan Baku Persediaan yang diencerkan dengan metanol hingga 100,0 ml.
- c) Siapkan masing-masing Larutan Baku Kerja 100 µg/ml, dengan memindahkan 200 µl masing-masing Larutan Baku Intermediet dan diencerkan masing-masing dengan metanol hingga 100,0 ml.

CATATAN 1 Seluruh larutan baku disimpan dalam wadah kaca amber tertutup rapat pada suhu 40 °C.

CATATAN 2 Larutan Baku Persediaan dan Intermediet tahan 6 bulan dan Larutan Baku Kerja Tahan 1 bulan, jika disimpan dalam kondisi seperti diatas.

7.7.2.5 Cara kerja

7.7.2.5.1 Ekstraksi contoh

- a) Timbang 10,0 g contoh yang sebelumnya telah dihomogenkan kedalam tabung sentrifuga 50 ml, pada masing-masing contoh ditambahkan 100 µl Larutan Baku Internal metakloramfenikol (100 µg/ml dalam methanol 1 ppb).
- b) Siapkan 1 blangko contoh dan 3 blangko contoh yang diperkaya (di "Spike") dianalisis dan akan dianalisis bersama dengan tiap set contoh. Tambahkan masing-masing 100 µl Larutan Baku Internal. Ke dalam contoh perbandingan untuk perolehan kembali (recovery) "Spike" dengan 0,5 ppb (50 µl Larutan Baku Kerja); 1,0 ppb (100 µl Larutan Baku Kerja) dan 2,0 ppb (200 µl Larutan Baku Kerja). Data yang diperoleh dari contoh spike akan digunakan untuk perhitungan.
- c) Tambahkan 1,5 ml larutan dapar fosfat (pH 6,8 ± 0,1) dan 200 µl larutan β-glukuronidase (800 unit) pada semua larutan dalam tabung blangko, blangko spike dan contoh. Homogenkan masing-masing dengan menggunakan ultra Turrax selama 30 - 60 detik pada suhu ruang.
- d) Inkubasikan seluruh tabung selama 90 menit pada suhu 30 °C. Setelah diinkubasi, contoh dapat disimpan dalam lemari es selama semalam jika pekerjaan dihentikan, sebaiknya pada tahap ini.
- e) Ambil dari lemari es dan biarkan hingga suhu ruang.
- f) Tambahkan masing-masing 15 ml etil asetat, campur isi tabung menggunakan vortex mixer selama 30 detik untuk mengekstraksi kloramfenikol. Sentrifus pada 2000 rpm selama 2 menit.
- g) Fase etil asetat (lapisan atas) menggunakan pipet Pasteur pindahkan kedalam tabung 50 ml yang bersih dan kering.
- h) Ulangi ekstraksi masing-masing contoh (butir f - g) dan kumpulkan masing-masing ekstrak.
- i) Uapkan masing-masing ekstrak etil asetat hingga kurang lebih 1 ml diatas penguap N-evap dibawah aliran gas nitrogen, menggunakan tangas pasir suhu kurang lebih 60°C. Tambahkan 4 ml larutan natrium klorida 4% pada semua tabung dan masing-masing di vortex selama 5 - 10 detik.
- j) Lanjutkan penguapan etil asetat diatas penguap hingga seluruh lapisan etil asetat habis dan akali meninggalkan sedikit residu berminyak.
- k) Tambahkan masing-masing tabung dengan 5 ml heksan kedalam, 4 ml lapisan Larutan natrium klorida (j). Vortex selama 10 detik. Sentrifus pada 2000 rpm selama 1 menit Pisahkan lapisan atas dan dibuang.
- l) Ulangi butir 6.k.

CATATAN Tahap butir m hingga p harus dilakukan dengan segera, secara berurutan jangan biarkan jat penjerap menjadi kering.

- m) Siapkan kolom C₁₈ untuk masing-masing contoh, blangko dan blangko spike dengan pencucian secara berurutan, masing-masing dengan 5 ml metanol, 5 ml kloroform, 5 ml metanol dan 10 ml air suling. Buang seluruh cairan cucian.
- n) Pindahkan secara kuantitatif masing-masing ekstrak (1) menggunakan Pipet Pasteur kedalam masing-masing kolom. Buang eluat.
- o) Cuci masing-masing tabung 2 kali tiap kali dengan 1 ml liter air suling, vortex dan pindahkan cucian kedalam kolom (n). Buang eluat.
- p) Cuci masing-masing kolom C₁₈ dengan 1 ml air suling diikuti dengan 2 ml metanol oil (20:80). Biakan Cairan pencuci keluar sempurna melalui kolom. Buang eluat
- q) Elusi Klormfenikol dari masing-masing kolom C₁₈ menggunakan 2 kali tiap kali dengan 1,5 ml asetonitril, kumpulkan eluat dalam tabung tertutup ulir 10 ml bersih dan kering.
- r) Uapkan masing-masing eluat asetonitril hingga lebih kurang 0,5 ml (perhatian: jangan sampai kering) diatas penguap pasir suhu 60 °C dengan aliran gas nitrogen.
- s) Masing-masing pindahkan secara kuantitatif ke dalam 1 ml. Cuci masing-masing tabung di vortex selama 5 detik dengan 0,5 ml asetonitril dan tambahkan cucian masing-masing kedalam vial. Uapkan hingga kering dengan aliran gas nitrogen pada suhu 60 °C. Perhatian cegah terhadap lembab melalui tahap ini.
- t) Untuk mengeringkan residu, tambahkan masing-masing dengan 200 ml Sylon HTP. Kemudian vial ditutup dan vortex selama 5 detik. Reaksikan pada suhu 60-70 °C di dalam tangas pasir selama 15 menit.
- u) Uapkan kelebihan perekasi diatas penguap N-Evap dengan aliran gas nitrogen hingga kurang lebih 10 m. Perhatian kelebihan waktu pengeringan pada tahap ini dapat menghilangkan analit.
- v) Rekonsitusi residu dalam 100 µl sikloheksan-heksan (60-40), vortex 5 detik
- w) Suntikkan sejumlah volume (µl) derivatisasi kedalam alat Kromatografi Gas yang dilengkapi dengan detektor penangkap Elektron atau Kromatografi Gas yang dilengkapi dengan Detektor Spektro massa untuk konfirmasi.

7.7.2.5.2 Kondisi dan pengaturan alat

- a) Gas pembawa: Helium, kecepatan 29 cm/detik.
- b. Gas Make up: Argon/metan , 95/5, kecepatan aliran 50 ml/detik.
- c) Suhu kolom awal: 80°C dioertahankan selama 1 menit.
- d) Program suhu: Suhu diprogram pada 30°C/menit hingga 260°C; dipertahankan selama 10 menit atau hingga isomer meta dan kloramfenikol terelusi. Kemudian diprogram pada 30°C/menit hingga suhu 300°C; pertahankan selama 5 menit untuk memastikan seluruh contoh terelusi.
- e) Suhu Persuntikan: 280°C.
- f) Suhu detektor: 350°C.
- g) Pengaturan kepekaan : 2/8 atenuasi.
- h) Retensi waktu diperkirakan : Kloramfenikof 10 hingga 11 menit.
Metakloramfenikol 9,5 hingga 10,5 menit.
- i) Respon diperkirakan : 50% simpangan skala penuh untuk 0,20 µg kloramfenikol.

7.7.2.6.3 Perhitungan

- a). Metakloramfenikol digunakan sebagai baku internal untuk menghitung kadar kloramfenikol. Dengan pengertian mengukur tinggi atau luas puncak masing-masing

komponen dalam 0,5 ppb: 1,0 ppb dan 2,0 ppb contoh yang telah diproses dengan prosedur sama. Hitung perbandingan tinggi atau luas area puncak untuk kloramfenikol dengan dibagi tinggi atau luas area puncak metakloramfenikol.

- b). Menggunakan kurva kalibrasi, kemudian nilai dihitung dengan contoh

$$Y = mx + b$$

dengan pengertian:

M = *slope*;

B = intersep.

$$Y = \frac{\text{Tinggi atau luas area puncak kloramfenikol}}{\text{Tinggi atau luas area puncak metakloramfenikol}}$$

X = kadar kloramfenikol dalam ppb

Koefisien korelasi kurva baku > 0,9945











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id